

## SCREENING OF ELICITOR FOR INDUCING FORMATION OF PHYTOALEXIN TO RICE PLANT AND BLIGHT CONTROLLING AGENT FOR RICE

**Publication number:** JP9124411

**Publication date:** 1997-05-13

**Inventor:** KOGA JINICHIRO; YAMAUCHI TOYOZO; SHIMURA MASARU; OGASAWARA NAGAHIRO

**Applicant:** SHOKUBUTSU BOUGIYO SYST KENKYU

**Classification:**

**- international:** A01G7/00; A01N35/06; A01N43/16; A01N43/36; A01N43/40; A01N43/60; A01N47/18; A01N65/00; C07C49/743; C07C49/743; A01G7/00; A01N35/00; A01N43/02; A01N43/34; A01N43/48; A01N47/10; A01N65/00; C07C49/00; C07C49/00; (IPC1-7): A01N65/00; C07C49/743; A01N35/06; A01G7/00; A01N43/16; A01N43/36; A01N43/40; A01N43/60; A01N47/18

**- european:**

**Application number:** JP19950309889 19951102

**Priority number(s):** JP19950309889 19951102

Report a data error here

### Abstract of JP9124411

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a screening method for an elicitor to induce rice plant to form phytoalexin and obtain a blight controlling agent for rice. **SOLUTION:** This process for screening an elicitor to induce rice plant to form phytoalexin comprises the use of a young rice plant as the test plant, the application of a test specimen to a proper part of the young rice plant and the screening of elicitor using the phytoalexin formed in the plant as an index substance. The blight controlling agent for rice is produced by using a specific compound having action to induce the formation of phytoalexin to rice plant as an active component. Cerebroside compounds PO8 and PO9 effective for inducing the formation of phytoalexin to rice plant can be produced by culturing the pathogen of rice blast and extracting the cultured cell with an organic solvent. This process enables simple and high accuracy screening of an elicitor capable of inducing a rice plant to produce phytoalexin and provides a low-toxic non-polluting rice blight controlling agent free from residual toxicity.

---

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-124411

(43)公開日 平成9年(1997)5月13日

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 0 1 N 35/06			A 0 1 N 35/06	
A 0 1 G 7/00	6 0 3		A 0 1 G 7/00	6 0 3
A 0 1 N 43/16			A 0 1 N 43/16	A
43/36			43/36	A
43/40	1 0 1		43/40	1 0 1 D
審査請求 有 請求項の数4 F D (全 14 頁) 最終頁に続く				

(21)出願番号 特願平7-309889

(22)出願日 平成7年(1995)11月2日

(71)出願人 395002870

株式会社植物防御システム研究所  
新潟県西蒲原郡西川町大字曾根1962番地

(72)発明者 古賀 仁一郎

新潟県西蒲原郡西川町大字曾根1962番地  
株式会社植物防御システム研究所内

(72)発明者 山内 豊蔵

新潟県西蒲原郡西川町大字曾根1962番地  
株式会社植物防御システム研究所内

(72)発明者 志村 勝

新潟県西蒲原郡西川町大字曾根1962番地  
株式会社植物防御システム研究所内

(74)代理人 弁理士 須藤 政彦

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 稲にファイトアレキシンの生成を誘導するエリシターのスクリーニング方法及び稲病害防除剤

(57)【要約】

【課題】 稲にファイトアレキシンの生成を誘導するエリシターのスクリーニング方法及び稲病害防除剤を提供する。

【解決手段】 稲にファイトアレキシンの生成を誘導するエリシターをスクリーニングする方法であって、試験植物として稲幼植物を使用し、試験試料を該稲幼植物の適宜の部位に施用し、該植物体中に生成されたファイトアレキシンを指標物質としてエリシターをスクリーニングすることからなる前記エリシターのスクリーニング方法。また、稲にファイトアレキシンの生成を誘導する作用を有する特定の化合物を有効成分とする稲病害防除剤。更に、稲いもち病菌を培養し、その菌体から有機溶媒で抽出することによる稲にファイトアレキシンの生成を誘導する作用を有するセレブロサイド化合物P O 8、P O 9の製造方法。

【効果】 稲にファイトアレキシンの生成を誘導するエリシターを簡便かつ高精度でスクリーニングすることができる。また、残留毒性のない低毒性、無公害の稲病害防除剤を提供することができる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 稲にファイトアレキシンの生成を誘導するエリシターをスクリーニングする方法であって、試験植物として稲幼植物を使用し、試験試料を該稲幼植物の適宜の部位に施用し、該植物体中に生成された特定のファイトアレキシンを指標物質としてエリシターをスクリーニングすることを特徴とする前記エリシターのスクリーニング方法。

【請求項2】 試験試料を稲幼植物の稲葉の先端部分に滴下施用し、該植物体中に生成されたファイトアレキシンを溶媒抽出し、稲ファイトアレキシンのファイトカサン、モミラクトンAを指標物質として高速液体クロマト（HPLC）により分析することを特徴とする請求項1記載の前記エリシターのスクリーニング方法。

【請求項3】 請求項1記載のスクリーニング方法によってスクリーニングされた稲にファイトアレキシンの生成を誘導する作用を有する2-ピラジンカルボン酸、ピコリン酸、2, 6-ピリジンジカルボン酸、7, 3-ピリジンジカルボン酸、ピロール-2-カルボン酸、オキゾン酸、セレブロサイド化合物P08、またはP09から選択される1種または2種以上の物質を有効成分とする稲病害防除剤。

【請求項4】 稲いもち病菌を培養し、その菌体から有機溶媒で抽出することを特徴とする稲にファイトアレキシンの生成を誘導する作用を有するセレブロサイド化合物P08、またはP09の製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、稲にファイトアレキシンの生成を誘導する性質を有するエリシターのスクリーニング方法、及び該スクリーニング方法によってスクリーニングされたエリシターを有効成分とする稲病害防除剤等に関するものである。更に詳しくは、本発明は、稲にファイトアレキシンの生成を誘導するエリシターを迅速かつ正確にスクリーニングする方法であって、試験用の稲を栽培し、試験試料を該稲植物の適宜の部位に施用し、稲植物体中に生成された特定のファイトアレキシンをスクリーニングの指標物質としてその分析を行い、それによって、稲にファイトカサン、モミラクトン等のファイトアレキシンの生成を誘導する性質を持った物質をスクリーニングする方法に関するものである。これらのファイトアレキシンは、稲の病害、例えば、稲いもち病菌、稲紋枯れ病菌に強い抗菌性を有するため、稲にファイトアレキシンの生成を誘導する性質を有するエリシターは稲病害防除剤の有効成分として有用である。

【0002】また、本発明は、稲にファイトアレキシンの生成を誘導する作用を有するセレブロサイド化合物P08、P09に関し、該セレブロサイド化合物P08、P09を稲病害防除剤として使用する方法、更には、稲いもち病菌を液体培地で培養後、菌体を分離し、菌体を

有機溶媒で抽出し、HPLC等で精製することによる該セレブロサイド化合物P08、P09の製造方法に関するものである。また、このようにして得たセレブロサイド化合物P08、P09を稲の葉に施用することにより、稲にファイトアレキシンであるファイトカサン、モミラクトンの生成を誘導させる方法に関するものである。これらのファイトアレキシンは、稲の病害、例えば、稲いもち病菌、稲紋枯れ病菌に強い抗菌性を有するため、セレブロサイド化合物P08、P09は稲病害防除剤の有効成分として有用である。

## 【0003】

【従来の技術】一般に、植物は病原菌と接触すると抵抗性反応（過敏感反応）を示し、反応部位の周囲の組織に病原菌に対し抗菌性を示すファイトアレキシンを産生することが知られている。稲のファイトアレキシンとしては、モミラクトンA、B、オリザレキシンA、B、C、D、E、F、S、サクラネチン、オリザリクアシドA、B、オリザライドA、Bが知られており、その他に、本発明者等が見出したファイトカサンA、B、C、D（特願平7-43520号）がある。

【0004】ファイトアレキシンを植物体中に産生、誘導する物質はエリシターと称され（Keen, N.T.; Science 187:74-75 (1975)）、これまでに多くの物質が植物病原菌から分離されている。代表的なエリシターとしては、多糖物質としてPhytophthora megasperma f. sp. q lycinea から分離されたhepta- $\beta$ -D-グルコピラノシド（Sharp, J. K., B. Valentand, P. Albershim; J. Biol. Chem. 259:11321-11336 (1984)）、蛋白質質としてMonilinia fructicolaから分離されたモニコリンA（Cruickshank, I. A. M. and D. R. Perrin; Life Sci. 7:449-458 (1968)）、脂質としてPhytophthora infestansから分離されたエイコサペンタエン酸（Bostock, R. M., J. Kuc and R. A. Laine; Science 212:67-69 (1975)）がある。

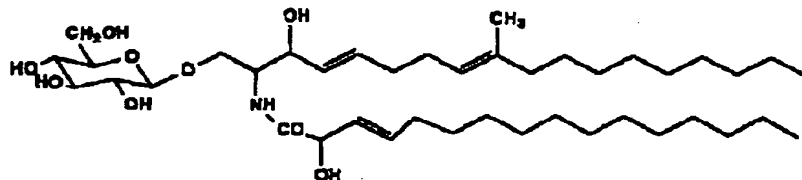
【0005】エリシターは、前記のように植物体中に病害菌に抗菌性を示すファイトアレキシンの産生を誘導する作用を有することから、従来の農薬とは異なる作用による安全性の高い植物病害防除剤の有効成分となり得る物質と考えられ、有用なエリシターを見出すこと、及び有用なエリシターを見出すための方法として、エリシター活性のある物質を迅速かつ簡便に探索することが可能な新しい探索方法が強く求められていた。

## 【0006】

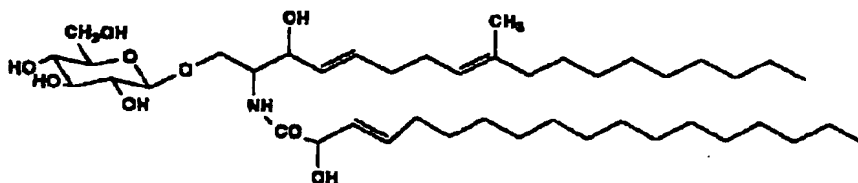
【発明が解決しようとする課題】このような状況の中で、本発明者等は、上記従来技術に鑑みて、稲植物にファイトアレキシンの生成を誘導する有用なエリシターを探索するための新しい探索方法を開発することを目標として鋭意研究を積み重ねてきたが、エリシター活性のある物質を個体稲植物を使ってスクリーニングする方法は非常に難しく、これまでその有効な手法は全く確立され

ていなかったと云える。そこで、本発明者等は、その有効な手法を開発すべく種々検討を重ねる中で、試験稲植物の種類、稲の栽培方法、試験試料の施用方法、ファイトアレキシンの分析方法等の基本技術を新たに確立することに成功し、それによってエリシター活性のある物質をスクリーニングすることが可能となることを見出した。

【0007】すなわち、試験に使用する稲について検討した結果、試験稲植物の品種と種類、栽培温度・湿度、試験稲植物の令期、試験試料の施用部位等がきわめて重要であることがわかり、それぞれ最適な条件を設定することでスクリーニング方法として使用し得ることが判明した。また、分析するファイトアレキシシンについては、ファイトカサンとモミラクソンを好適な例として、稲体中に誘導されたファイトアレキシシンの抽出方法とHPLCによる分析方法を定めた。上記の方法によって、種々\*



P08



P09

【0010】本発明者等がエリシター活性のある物質として見出したセブレロサイド化合物P08、P09の化学構造については、既に報告があり、P08はセブレロサイドA (Sitrin, R. D. et al.; J. Antibiot. 41: 469-480 (1988))と、また、P09はPEN11 (Kawai, G. et al.; Agric. Biol. Chem. 49: 2137-2146 (1985))、セブレロサイドC (Sitrin, R. D. et al.; J. Antibiot. 41: 469-480 (1988))と同一の構造を持つ。報告されているこれらの物質は微生物の生産物であるが、その微生物はP08、P09の生産菌である稲いもち病菌と異なり、また、これらの物質についてP08、P09の有するエリシター活性の記載はない。更に、これらのセブレロサイド化合物を稲いもち病菌から分離したのは本発明者等が最初であり、他に報告例はない。

【0011】本発明は、上記のように、稲にファイトア

\*の物質を試験した結果、数種のエリシター活性のある化合物を見出した。

【0008】また、本発明者等は、上記スクリーニング方法を用いて、エリシター活性のある物質を、微生物生産物を対象として広くスクリーニングした結果、稲いもち病菌の生産物がこのようなエリシター活性を有することを見出した。更に、この物質を溶媒抽出、カラムクロマトグラフィー等の手段により単離し、2種の活性物質を得て、その構造解析を行った結果、下記構造式を示すセブレロサイド化合物P08、P09物質であることを明らかにし、また、これらの物質が稲いもち病防除剤の有効成分として有効であることを明らかにして、本発明を完成させるに至った。

【0009】

【化1】

レキシンの生成を誘導するエリシターをスクリーニングする方法に関するものであり、試験植物として稲幼植物を用い、稲体中に生成されたファイトアレキシシン(ファイトカサン、モミラクソン等)をHPLCにより分析する方法に関するものである。また、この方法によって得られるエリシター活性物質に関するものである。すなわち、本発明は、稲にファイトアレキシシンの生成を誘導するエリシターをスクリーニングする方法を提供することを目的とするものである。また、本発明は、稲ファイトアレキシシンのファイトカサン、モミラクソンAを指標物質として、稲にファイトアレキシシンの生成を誘導する性質を有するエリシターを迅速かつ簡便に探索するためのスクリーニング方法を提供することを目的とするものである。また、本発明は、稲にファイトアレキシシンの生成を誘導する作用を有する特定の物質を有効成分とする稲

病害防除剤を提供することを目的とするものである。

【0012】また、本発明は、稲いもち病菌の培養菌体から稲にファイトアレキシンの生成を誘導する性質を有するセレブロサイド化合物P08、P09を採取することによりセレブロサイド化合物P08、P09を製造する方法を提供することを目的とするものである。本発明は、また、セレブロサイド化合物P08、P09を稲に施用することによって稲いもち病害、稲紋枯れ病害を防除するための稲病害防除剤を提供することを目的とするものである。

【0013】

【課題を解決するための手段】前記課題を解決するための本発明は、稲にファイトアレキシンの生成を誘導するエリシターをスクリーニングする方法であって、試験植物として稲幼植物を使用し、試験試料を該稲幼植物の適宜の部位に施用し、該植物体中に生成された特定のファイトアレキシンを指標物質としてエリシターをスクリーニングすることを特徴とする前記エリシターのスクリーニング方法、に係るものである。また、本発明は、試験試料を稲幼植物の稲葉の先端部分に滴下施用し、該植物体中に生成されたファイトアレキシンを溶媒抽出し、稲ファイトアレキシンのファイトカサン、モミラクトンAを指標物質として高速液体クロマト（HPLC）により分析することを特徴とする上記の前記エリシターのスクリーニング方法、を好ましい態様とするものである。また、本発明は、上記のスクリーニング方法によってスクリーニングされた稲にファイトアレキシンの生成を誘導する作用を有する2-ピラジンカルボン酸、ピコリン酸、2,6-ピリジンジカルボン酸、7,3-ピリジンジカルボン酸、ピロール2-カルボン酸、オキソ酸、セレブロサイド化合物P08、またはP09から選択される1種または2種以上の物質を有効成分とする稲病害防除剤、に係るものである。更に、本発明は、稲いもち病菌を培養し、その菌体から有機溶媒で抽出することを特徴とする稲にファイトアレキシンの生成を誘導する作用を有するセレブロサイド化合物P08、またはP09の製造方法、に係るものである。

【0014】

【発明の実施の形態】次に、本発明について更に詳細に説明する。本発明者等は、稲にファイトアレキシンを産生、誘導させる物質のスクリーニング方法として、試験稲植物の品種と種類、栽培条件、ファイトアレキシンの分析条件等について詳細に検討した。試験に使用する稲の品種として、あきたこまち、こしひかり等が適当であること、培土は稲の生育に必要な窒素、リン酸、カリを適宜含む顆粒状の培土、具体的には、ホーネンズ培土1号（全農）を使用することが適当であること、試験稲植物の栽培条件として、温度、湿度、照度の制御が重要であることがわかった。具体的には、例えば、芽の出た種子をポットに植え、30～32℃で暗室で約2～3日栽

培し、芽が土の上に2～3cmぐらい伸びた時に人工気象室内に移す。人工気象室は温度18～20℃で、湿度80～85%、照度2000～3000luxの条件に保つ。次に、第3葉が出た段階で照度3000～4000lux、湿度95～100%、日中温度27～30℃の条件に換え、第6葉が完全に展開するまで栽培する。これらの栽培条件はそれと同等の範囲において適宜変更し得ることは云うまでもない。また、試験試料は第6葉令の稲葉の先端部分にキャピラリービペットで滴下施用する方法を好適なものとして定めた。

【0015】試料を施用した稲は更に1週間栽培した後、施用部位の葉を細断して酢酸エチル、メタノール等の溶媒で抽出処理を行う。抽出物を高速液体クロマトグラフ（HPLC）で分析し、例えば、ファイトカサン、モミラクトンについては、保持時間35分前後のファイトカサンA、保持時間43分前後のファイトカサンB、保持時間50分前後のモミラクトンAの各ピーク高から誘導されるファイトアレキシンの量を求めることができる。他のファイトアレキシンのについても同様にして分析することができる。

【0016】上記スクリーニング方法は、基本的には次のような構成からなる。

（1）試験植物（稲）

- ① 品種：あきたこまち、こしひかり
- ② 令期：稲幼植物、特に、第6葉令
- ③ 栽培：第6葉が完全に展開するまで栽培

【0017】（2）試験試料の施用

- ① 施用部位：稲葉、特に、その先端部分
- ② 施用方法：キャピラリービペット等で滴下施用
- ③ 施用後の栽培期間：約1週間

【0018】（3）抽出及び分析

- ① 試料の調製：施用部位の葉を細断
- ② 抽出：酢酸エチル、メタノール等の溶媒抽出
- ③ 分析：高速液体クロマトグラフ（HPLC）分析

【0019】このスクリーニング方法によって後記の実施例2に示すような化合物が稲にファイトアレキシンを産生、誘導させる物質として見出された。

【0020】また、本発明者等は、上記スクリーニング方法を用いて、ファイトアレキシンを産出、誘導させる物質を検索することを目標として、稲の葉面に試料を塗布して適時栽培後、稲体中に産出されるファイトアレキシンの量を測定する試験を種々実施する過程において、稲いもち病菌菌体の有機溶媒抽出物がファイトアレキシンを誘導する高い活性を示すことを認めた。従って、その有効成分（P08、P09）は、稲いもち病菌の菌体を、例えば、酢酸エチル、アセトン、エタノール等の溶媒で抽出処理し、高速液体クロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー等の手段により精製処理することによって単一成分のものとして分離することができる。

【0021】本発明で使用する稲いもち病菌を培養す

る液体培養としては、植物あるいは微生物の抽出物を使用する、従来から糸状菌の培養に用いられている培地であればいずれも使用できるが、好ましくは、例えば、P SY培地等が例示される。これらの培地にはジャがいも等の植物抽出成分、また、酵母の抽出物等が用いられる。

【0022】活性成分を含む稲いもち病菌の菌体を得るには上記のような適宜な液体培地にいもち病菌を接種して、例えば、28℃で、180rpmで7日間、施回培養すればよい。

【0023】PO8、PO9の抽出、分離の具体的プロセスとしては、例えば、稲いもち病菌の菌体を酢酸エチル等の溶媒で抽出後、TSK gel ODS120A、ODS120T（東ソー社製）等のカラムによる高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による分画、濃縮乾固等の精製プロセスにより精製し、単離する方法が好適なものとして例示されるが、該方法に限らず、他の同様の精製手段を適宜組み合わせることも可能であり、その精製プロセスについては特に限定されるものではない。

【0024】本発明に係るPO8、PO9は次のような性質を有する。

1) FAB-MSによる質量分析で、PO8は分子量725、PO9は分子量753を示した。

2) PO8、PO9はそれぞれ図1～2に示される赤外部吸収スペクトラムを示す。

3) PO8、PO9はそれぞれ図3～4に示される<sup>1</sup>H-NMRスペクトラムを示す。

4) PO8、PO9はそれぞれ図5～6に示される<sup>13</sup>C-NMRスペクトラムを示す。

5) PO8、PO9は、稲にファイトアレキシンの産生を誘導する作用を有する。誘導されるファイトアレキシンとしてはファイトカサンA、B、C、D、モミラクトンA、B等である。これらのファイトアレキシンは稲いもち病菌、稲紋枯れ病菌に対する強い抗菌活性を有しているために、これらの物質の誘導を受けた稲は、病害菌に対し抵抗性を示すものと考えられる。

【0025】本発明に係るPO8、PO9は、後記する実施例で示したように、稲に抗菌性物質のファイトアレキシンの産生を誘導する性質を有することから、PO8、PO9は稲いもち病害防除剤、稲紋枯れ病害防除剤の有効成分として有用である。すなわち、該化合物を適宜の形態の薬剤として稲に施用することにより稲いもち病の発生及び稲紋枯れ病の発生を防ぐことができる。

【0026】本発明の薬剤は、後記する実施例で示したように、その使用目的に応じて、上記有効量を含む形で適宜の形態に製剤化すればよく、その形態、製剤手段等は特に限定されるものではない。稲にファイトアレキシシ

カラム： TSK-gel ODS 120T（4.6mm×300mm）

溶媒： アセトニトリル（45）：水（55）（容積比）

\* Nの生成を誘導する作用を有する化合物を稲に施用する方法としては、後記する実施例で記述したように、例えば、該化合物を0.1%のツイーン20を含むpH7.0の20mMリン酸緩衝液に溶解して、その溶液を稲に噴霧散布する方法等が好適なものとして例示されるが、これに限らず、その他の方法であってもよく、該化合物を稲に施用するための薬剤の形態、その使用形態、施用方法等は特に限定されるものではない。

【0027】

10 【実施例】以下に、実施例に基づいて本発明を具体的に説明するが、本発明は以下の実施例によって何ら限定されるものではない。

実施例1

（1）試験植物として用いる稲の栽培

稲の種子（品種：こしひかり、または、あきたこまち）を塩水で選別して不良な種子を除いた後、芽出し処理を行った。芽の出た種子を、ホーネンス培土1号（全農）を詰め下から水を浸み込ませた6号ポットに8粒植え、32℃で暗室で約2～3日栽培した。芽が土の上に2～3cmぐらいに伸びた時に人工気象室内のガラスケース内に移した。人工気象室は温度18℃、湿度80%、照度3000luxの条件に保ったが稲ポットは若干遮光された場所に置いた。次に、第3葉が出た段階で照度3000lux、湿度100%、日中温度27～30℃の条件に換え、第6葉が完全に展開するまで栽培した。このようにして栽培した稲幼植物を以下の試験に供した。

【0028】（2）試料の施用とファイトアレキシンの誘導

30 試料は、表1に示されるように、試料1～7を準備した。試料溶液20μlを、キャピラリーピペットを用い、上記のようにして栽培した稲幼植物の第6葉の先端部分の10ポイント（部位）に施用した。試料は0.1%のツイーン20（和光純薬社製）を含むpH5.5（試料1）あるいはpH6.5（試料2～7）の20mMリン酸緩衝液に所定濃度溶解して用いた。試料を施用した稲は湿度80%、照度2000lux、夜温度18℃、昼温度25～26℃で3日間栽培した。更に、昼だけ湿度を100%に設定し4日間栽培を続けた。

【0029】（3）ファイトアレキシンの抽出と分析

40 試料を施用した稲葉を8枚とり、細断後、酢酸エチルを5mlと0.1N Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>を5ml加えて一晩振盪抽出を行った。抽出物は遠心機で処理（5000rpm、4℃、20分）し、酢酸エチル相を分取して濃縮乾固した。残渣を0.4mlのエタノールに溶かし、0.6mlの0.02N HClを加え混合した。これを遠心処理して得られた上清液100μlをHPLC分析に供した。HPLCの条件は以下の通りである。

流速: 1.2 ml/min

温度: 50℃

検出器: UV 280nm (ファイトカサン) / 215nm (モミラクトン)

【0030】(4) 結果

\*【0031】

この条件で試料1～7により稲葉中に誘導されたファイトアレキシンの量

【表1】

トアレキシンの量は下表の通りであった。

\*

誘導されたファイトアレキシンの量

試料番号	試料濃度 (%)	ファイトアレキシンの量 $\mu\text{g/g}$ 葉		
		ファイトカサンA	ファイトカサンB	モミラクトンA
1	0.04	21.3	26.7	42.1
2	0.1	1.3	5.6	5.7
3	"	4.9	10.5	7.8
4	"	2.6	9.8	11.7
5	"	2.6	8.0	13.3
6	"	3.1	5.7	11.7
7	"	20.2	28.9	18.8

【0032】表1に示されるように、試料1～7は、稲にファイトアレキシンの生成を誘導する作用を有する物質を含有する。

【0033】実施例2

(1) 稲にファイトアレキシンの生成を誘導する作用を有する物質の同定

前記試料1～7について、その有効成分を分析した結果、次のような化合物が稲にファイトアレキシンの生成を誘導する作用を有する物質として同定された。

① ファイトカサンEL (下記の構造式で示される。)

② 2-ピラジンカルボン酸 (2-Pyridinedicarboxylic acid)

③ ピコリン酸 (Picolinic acid)

④ 2,6-ピリジンジカルボン酸 (2,6-Pyridinedicarboxylic acid)

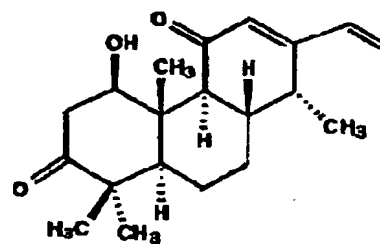
⑤ 7,3-ピリジンジカルボン酸 (7,3-Pyridinedicarboxylic acid)

⑥ ピロール-2-カルボン酸 (Pyrrole-2-carboxylic acid)

⑦ オキソニン酸 (Oxonic acid potassium salt)

【0034】

【化2】



【0035】上記化合物のうち、ファイトカサンEL

は、稲より単離した新規な天然物質であり、次のような性質を有する。

1) 無色のガム状物質であり、アセトン、クロロホルム、メタノール、エタノールに可溶であり、水に100 ppm前後の濃度で溶解する。

2) 高分解能質量分析による精密分子量は316.2062 ( $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{O}_2$  としての計算値316.2065)を示した。

3) 図7に示される赤外部吸収スペクトルを示す。

4) 稲にファイトアレキシンの産生を誘導する作用を有する。

5) 稲いもち病菌の胞子の発芽及び菌糸の伸長を阻害する作用を有する。胞子の発芽を50%阻害するファイトカサンELの濃度は7 ppmであり、また、この濃度で菌糸の伸長はかなり阻害される。

6) 10 ppmの濃度で稲紋枯れ病菌の菌糸の伸長を阻害する。

【0036】上記化合物は、表1に示した試料1～7の有効成分として、稲にファイトアレキシンの生成を誘導する作用を有し、稲病害防除剤の有効成分として有効であることがわかった。

## 【0037】実施例3

## PO8、PO9の製造

## (1) 稲いもち病菌の培養

皮をむいたじゃがいも200gを細断し、1Lの蒸留水を入れて121℃、60分間、オートクレーブにかけた。加熱処理後、じゃがいもをガーゼで濾別し、1Lの濾液を調製した。濾液に2%のサッカロースと0.5%の酵母エキスを加えてPSY培地を調製した。この培地200mlを500ml容の三角フラスコに分注して121℃、40分間殺菌し、冷却後、稲いもち病菌（レース031株）を接種した。培養は、26℃、150rpmの施回培養を7日間行った。

## 【0038】(2) PO8、PO9の抽出、精製

培養終了後、培養液をガーゼで濾過し、稲いもち病菌の菌体採取した。菌体重量の5倍量程度の蒸留水を加え、pH10.5に調整後、水と同容の酢酸エチルを加え攪拌、抽出した。酢酸エチル層を分取、減圧下、酢酸エチルを溜去し、オイル状の残渣を得た。残渣を85%エタノールに溶解した試料液を、TSK gel ODS 120Aのカラム（21.5mm×375mm、東ソー社製）に注入し、91%エタノールで溶出した。PO8は保持時間25分前後、PO9は保持時間30分前後に溶出された。それぞれの画分を集め、同じカラムで再クロマトを行った。PO8は81%エタノールで保持時間60分前後、PO9は86%エタノールで保持時間40分前後に溶出された。更に、それぞれの画分を集め、TSK gel ODS 120Tのカラム（21.5mm×375mm、東ソー社製）にかけ、95%アセトニトリ＊

カラム： TSK-gel ODS 120T（4.6mm×300mm、東ソー社製）

溶媒： アセトニトリル（45）：水（55）（容積比）

流速： 1.2ml/min

温度： 50℃

検出器： UV 280nm（ファイトカサン）／215nm（モミラクトン）

【0042】次の表2に、誘導されたファイトアレキシン量を示す。表2の結果から明らかなように、本発明のPO8、PO9は稲にファイトアレキシン（ファイトカサンA、B、C、D、モミラクトンA、B）を高いレベルで

＊ルで分画すると、PO8は保持時間43分前後、PO9は保持時間60分前後に溶出された。それぞれの画分を集め溶媒を溜去すると、PO8、PO9の純品が得られた。

## 【0039】実施例4

## PO8、PO9によるファイトアレキシンの誘導

## (1) ファイトアレキシンの産生

実施例1で得たPO8、PO9をツイーン20（和光純薬製）を0.1%含むリン酸緩衝液（20mM、pH6.5）に溶かし、50ppmの試料溶液を調製した。この各濃度の試料溶液及び試料を含まない溶媒液を、ポットで栽培した稲（品種：あきたこまち）に施用して、ファイトアレキシン産生の誘導活性を測定した。この場合、施用部位は完全展開した第6葉の先端部分とし、その適宜間隔をおいた10ポイントにキャピラリービペットで各試料溶液を20μl（1葉あたり）滴下施用した。

## 【0040】(2) ファイトアレキシンの抽出

試料溶液で処理した稲を人工気象室で7日間培養後、処理葉を8枚とり、細断後、酢酸エチルを5mlと0.1規定炭酸ナトリウム液を5ml（pH10）を加えて一晚振盪した。酢酸エチル相を分取してこれを濃縮乾固し、残渣を0.4mlのエタノールに溶かした。

## 【0041】(3) HPLCによる分析

この溶液に0.02規定の塩酸1を0.6ml加え、混合して、遠心機にかけ、得られた上清液のうち100μlを高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による分析に供した。HPLCの条件は下記の通りである。

＊ルの生成量で誘導する活性を有することが判明した。

## 【0043】

## 【表2】

添加量 (μg/ml)	誘導されたファイトアレキシン量(μg/g葉)					
	ファイトカサン A	ファイトカサン B	ファイトカサン C	ファイトカサン D	モミラクトン A	モミラクトン B
0	1.4	2.1	0.9	0.3	5.7	0.1
PO8 50	8.2	8.8	3.9	1.6	21.5	3.6
PO9 50	20.5	20.1	5.7	3.8	45.0	11.1

## 【0044】実施例5

稲のいもち病菌感染防御試験

## (1) 方法

50 稲（品種：あきたこまち）種子を、培土を詰めた鉢に1



鉢あたり8粒播種し、第6葉展開期まで育て、1区を12鉢とし、2区を試験に供した。PO9を0.1%のTween20を含むpH7.0の20mMリン酸緩衝液で50 $\mu$ g/mlの濃度で溶解、この30mlを12鉢の稲に噴霧した。また、対照として0.1%のTween20を含むpH7.0の20mMリン酸緩衝液30mlを12鉢の稲に噴霧した。室温で4時間放置し、葉面を乾燥させてから人工気象室に入れ栽培した。栽培7日後に稲いもち病菌レース007株(親和性株)の孢子懸濁液を30mlずつ各区の稲葉面に噴霧し、その後、加湿、暗黒下、24時間放置して接種処理を行った。その後、人工気象室に移して栽培、5日後に各区の感染葉と無感\*

PO8(またはPO9) ————— 50 $\mu$ g/ml  
 Tween20(和光純薬社製) ————— 1000ppm  
 リン酸カリウム緩衝液(20mM, pH7.0) ——— 100ml

#### 【0047】実施例7

稲紋枯れ病害防除剤

※ PO8(またはPO9)と他の成分を以下の配合割合で配合して常法により液剤を調製した。

PO8(またはPO9) ————— 50 $\mu$ g/ml  
 Tween20(和光純薬社製) ————— 1000ppm  
 リン酸カリウム緩衝液(20mM, pH7.0) ——— 100ml

#### 【0048】

【発明の効果】本発明は、稲にファイトアレキシンの生成を誘導させる物質のスクリーニング方法及び稲にファイトアレキシンの生成を誘導する作用を有する特定の物質を有効成分とする稲病害防除剤等に関するものであり、本発明によれば、次のような効果が奏される。

1) 稲にファイトアレキシンの生成を誘導するエリシターを簡便かつ高精度でスクリーニングすることができる。

2) 稲にファイトアレキシンの生成を誘導するエリシターをスクリーニングするための指標物質として稲ファイトアレキシンのファイトカサン、モミラクトンAを使用する方法、及びその分析方法が提供される。

3) 稲にファイトアレキシンの生成を誘導する作用を有する特定の物質を有効成分とする稲病害防除剤が提供される。

4) ファイトアレキシンは稲いもち病菌、及び稲紋枯れ病菌に抗菌性を持つことから、本発明のスクリーニング方法で選抜された物質は稲いもち病害防除剤、稲紋枯れ病害防除剤等の稲病害防除剤の有効成分として有用である。

\* 染葉の枚数を数え、いもち病の発病度を比較した。

#### 【0045】(2) 結果

その結果、試料を含まないリン酸緩衝液を噴霧した対照区では無感染葉数が33枚に対し感染葉数が119枚で発病率は78%、PO9散布区では無感染葉数が89枚に対し感染葉数が65枚で発病率は42%で発病抑制効果が明らかに認められた。別に実施したPO8についてもほぼ同様な結果が得られた。

#### 【0046】実施例6

稲いもち病害防除剤

PO8(またはPO9)と他の成分を以下の配合割合で配合して常法により液剤を調製した。

※ PO8(またはPO9)と他の成分を以下の配合割合で配合して常法により液剤を調製した。

5) セレブロサイド化合物PO8、PO9の製造方法が提供される。

6) 稲いもち病及び稲紋枯れ病の発病の抑制に有効であるばかりでなく、いわゆる残留毒性のない低毒性、無公害の稲病害防除剤を提供することができる。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】本発明に係るセレブロサイド化合物PO8の赤外部吸収スペクトルを示す。

【図2】本発明に係るセレブロサイド化合物PO9の赤外部吸収スペクトルを示す。

【図3】本発明に係るセレブロサイド化合物PO8の<sup>1</sup>H-NMRスペクトラムを示す。

【図4】本発明に係るセレブロサイド化合物PO9の<sup>1</sup>H-NMRスペクトラムを示す。

【図5】本発明に係るセレブロサイド化合物PO8の<sup>13</sup>C-NMRスペクトラム<sup>1</sup>を示す。

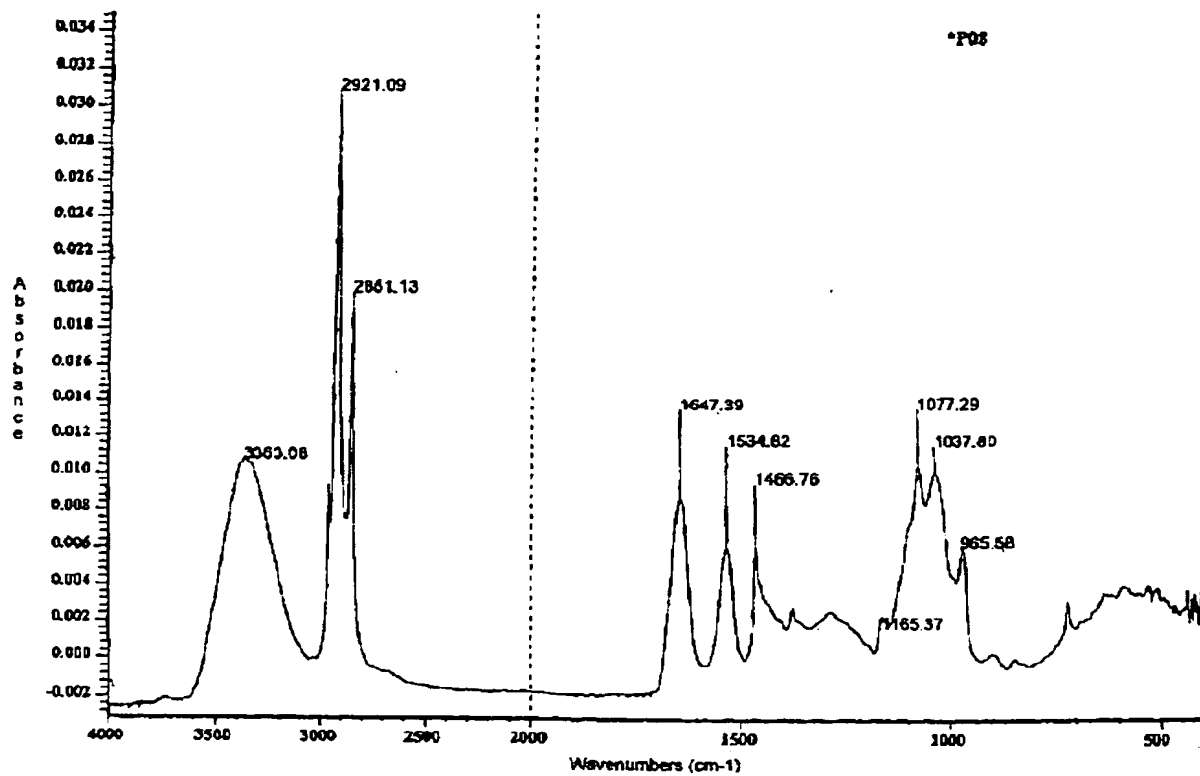
【図6】本発明に係るセレブロサイド化合物PO9の<sup>13</sup>C-NMRスペクトラム<sup>1</sup>を示す。

【図7】本発明に係るファイトカサンELの赤外部吸収スペクトルを示す。

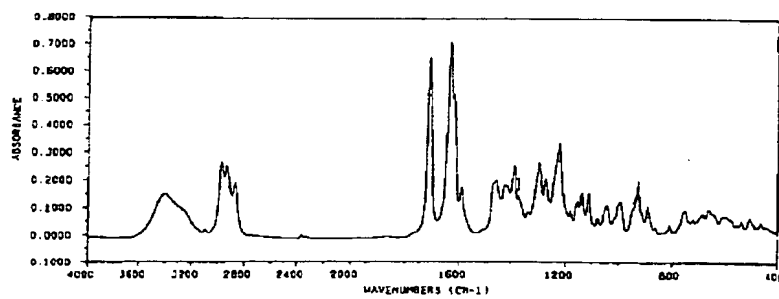
(9)

特開平9-124411

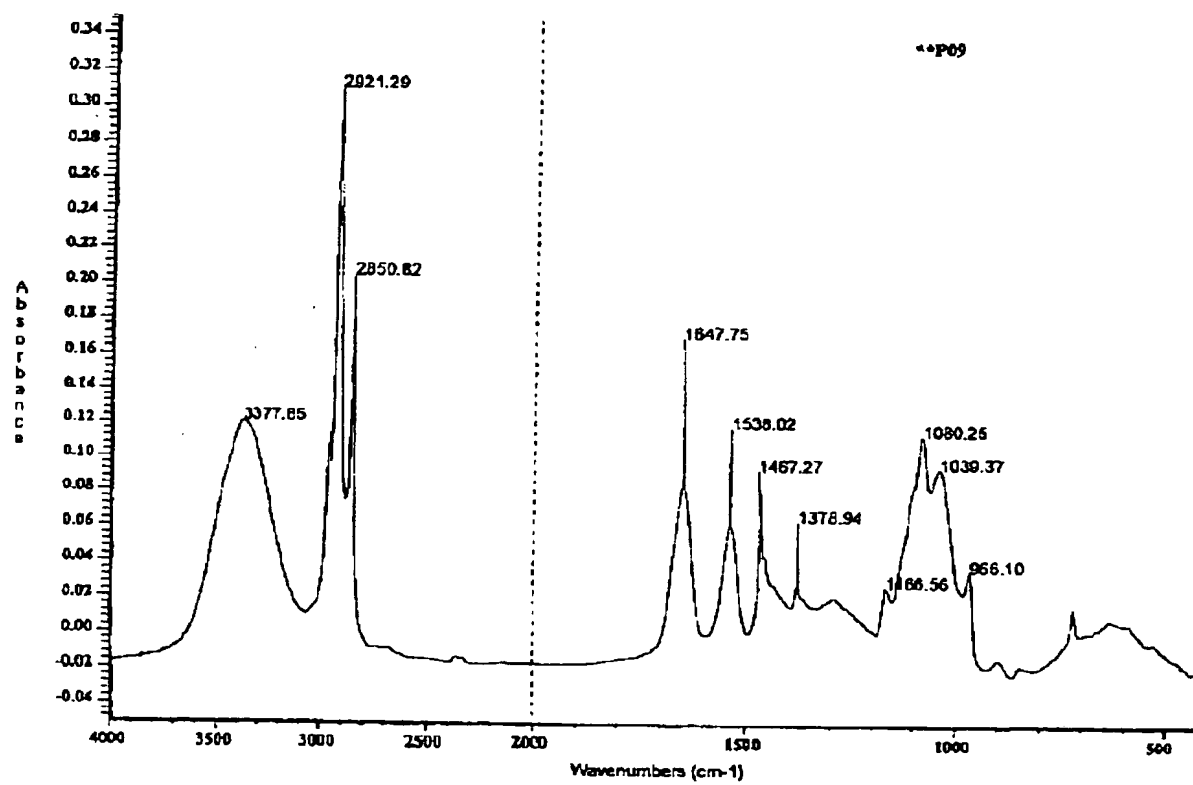
【図1】



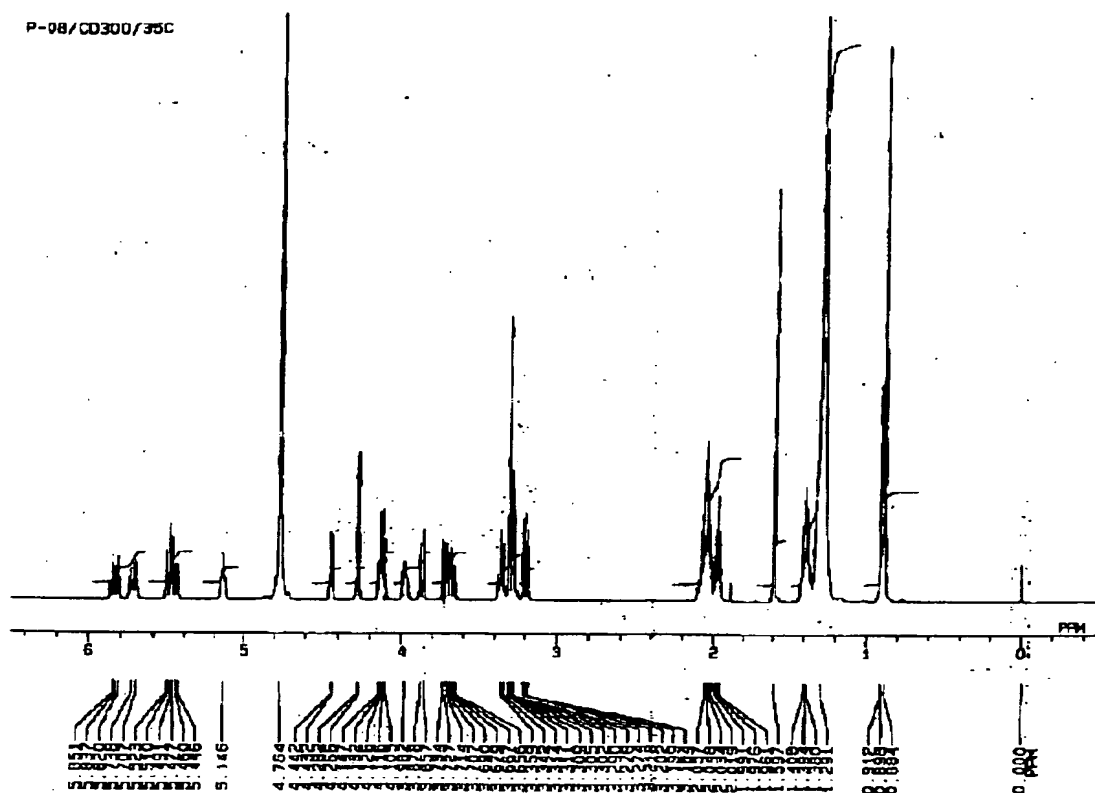
【図7】



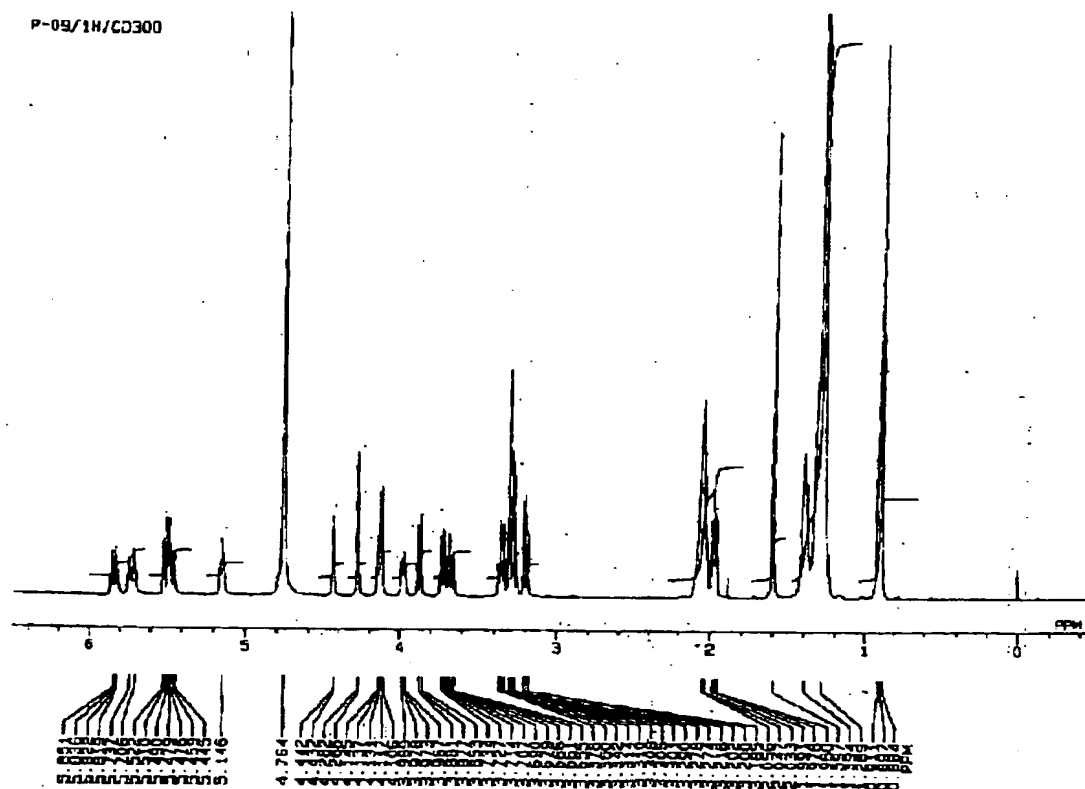
【図2】



P-08/CD300/35C



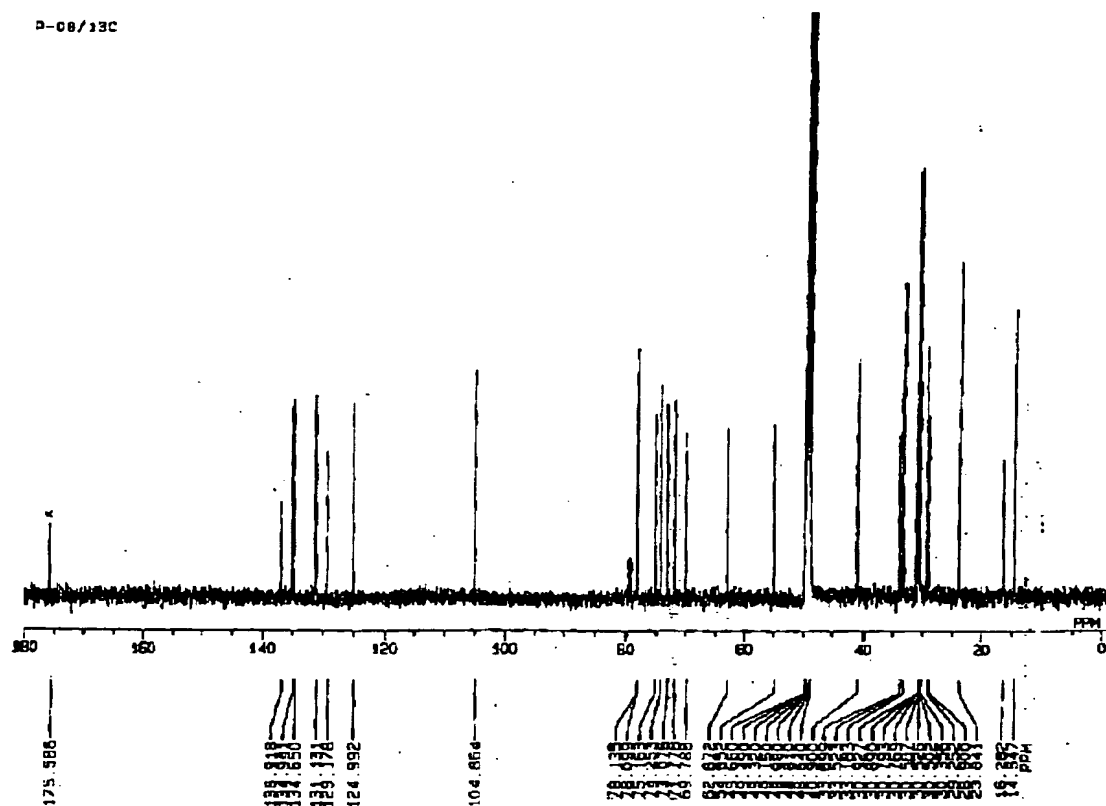
【図4】



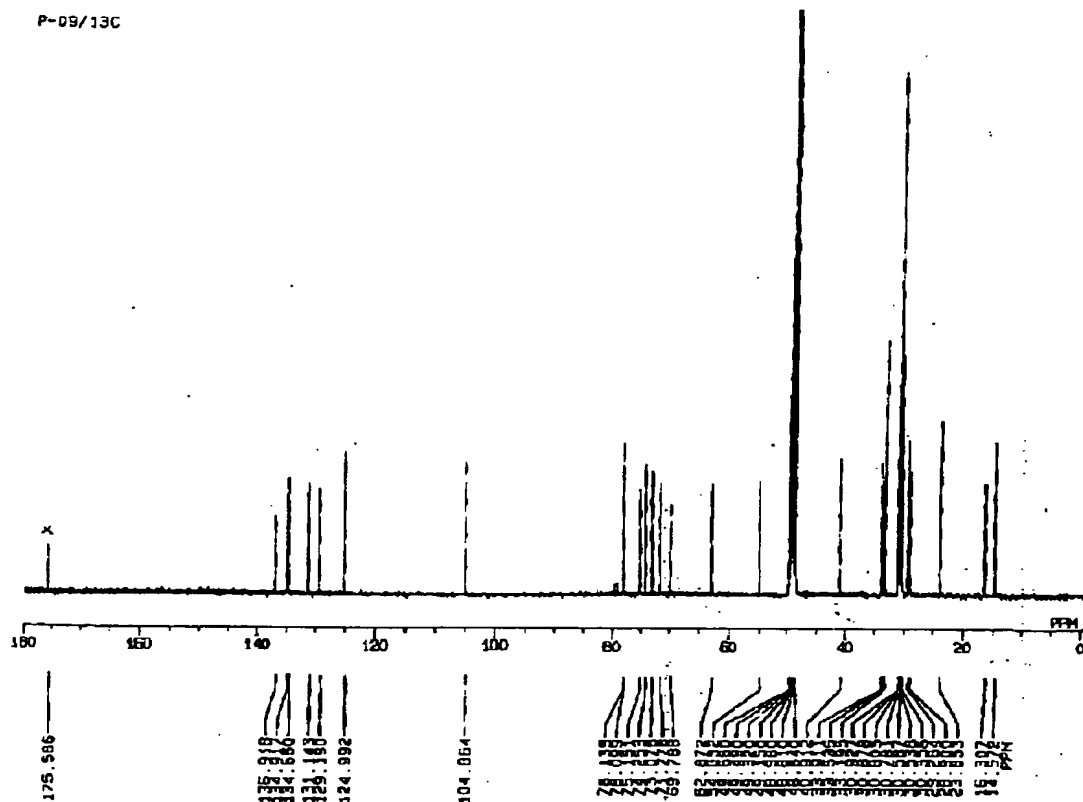
(13)

特開平9-124411

【図5】



【図6】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 0 1 N 43/60			A 0 1 N 43/60	
47/18	1 0 1		47/18	1 0 1 B
// A 0 1 N 65/00			65/00	Z
C 0 7 C 49/743		9049-4H	C 0 7 C 49/743	C

(72)発明者 小笠原 長宏  
新潟県西蒲原郡西川町大字曾根1962番地  
株式会社植物防御システム研究所内